

1. ヒトパピローマウイルスによる発がんの分子機構

温川 恭至, 清野 透

国立がんセンター研究所・ウイルス部

今から25年前 Harald zur Hausen 博士らによって子宮頸がんから16型ならびに18型ヒトパピローマウイルス(human papillomavirus: HPV)のDNAが発見され, その因果関係が初めて示唆された。その後の疫学的・分子生物学的研究から, 子宮頸がんはHPV感染によって発症することに疑いの余地はなくなり, HPVは子宮頸がんの原因ウイルスとして確定している。90%以上の子宮頸がんでは16型を始めとする一群のHPVがコードするE6とE7が必ず発現しており, それぞれp53, pRBがん抑制遺伝子産物を不活化することが明らかになっている。E6はテロメラーゼを活性化する機能も有しており, E6とE7は共同してヒト初代上皮細胞を高率に不死化することができる。これらの機能は本来, 分裂能を失い最終分化に向かう細胞をウイルス増殖に利用するために備わっていると考えられる。E6とE7の発現のみでは細胞はがん化しないが, E6, E7は細胞の不死化からがん化に至る多くの過程に関与していることが明らかになってきた。実際, 実験的にはE6とE7の発現に加えH-rasの変異さえあれば正常子宮頸部角化細胞に造腫瘍性が付与されることも示された。HPV感染と子宮頸がん発生との因果関係が確定的なものであることから, HPV感染予防ワクチンが対がん戦略として有効なものであることが推測される。しかしながら, HPV感染は性交渉開始後の大多数の女性で見られるほど蔓延しており, 第一世代HPVワクチンの現プロトコールでの長期間に渡る有効性やHPV型特異性について課題を残している。また, 既感染者には無効である。従って, HPV感染の自然史やウイルス蛋白の機能に関する分子基盤を解明していくことは, HPVワクチンを用いた感染予防のみならず新たな治療法の開発にとって不可欠である。本稿では, 最近明らかになったE6, E7の機能を紹介するとともに, HPV感染から子宮頸がんへ至る機構について概説したい。

はじめに

子宮頸がんから16型ならびに18型HPVのDNAを発見した功績^{10, 21)}に対し, ドイツがん研究センター(DKFZ)元総長のHarald zur Hausen博士に2008年ノーベル医学生理学賞が授与されることとなった。その意義を振り返る意味において本特集は時機を得たものである。

HPVは約8,000塩基対の環状二本鎖DNAをゲノムとして持ち, 正二十面体のキャプシド構造を外殻とする小型の

DNAウイルスである(図1A)。HPVは皮膚または粘膜の上皮に良性腫瘍性病変である乳頭腫{papilloma, 一般に皮膚では疣贅(verruca), 粘膜では広義のコンジローマ}あるいは異形成(dysplasia)を誘発する。これまでゲノム配列の相同性に基づき約120種類以上の遺伝子型(genotype)が見つかり, 疫学的にがんとの関連が示される高リスク型(16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51, 52, 58型等を含む約20の型)と, 尖形コンジローマ等の良性病変形成にとどまる低リスク型(6, 11型等)とに大別されている。興味深いことに, この発がんリスクを基にした疫学上の高リスク型HPVは, 分子系統樹上のあるサブグループに集中しており, 構造と機能の相関が示唆される(図2)^{2, 16, 43, 48)}。子宮頸がんの90%以上から特定の高リスク型HPV DNAが検出されており, そのうち16型が約半数を占めている。大規模疫学調査では99.7%の子宮頸がんから高リスク型HPV DNAが検出されるとの報告もある。HPV DNAが検出されない子宮頸がんにおいてもHPVが発がん過程において一

連絡先

〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1
国立がんセンター研究所・ウイルス部
TEL: 03-3542-2511 (Ex. 4703)
FAX: 03-3543-2181
E-mail: tyugawa@ncc.go.jp

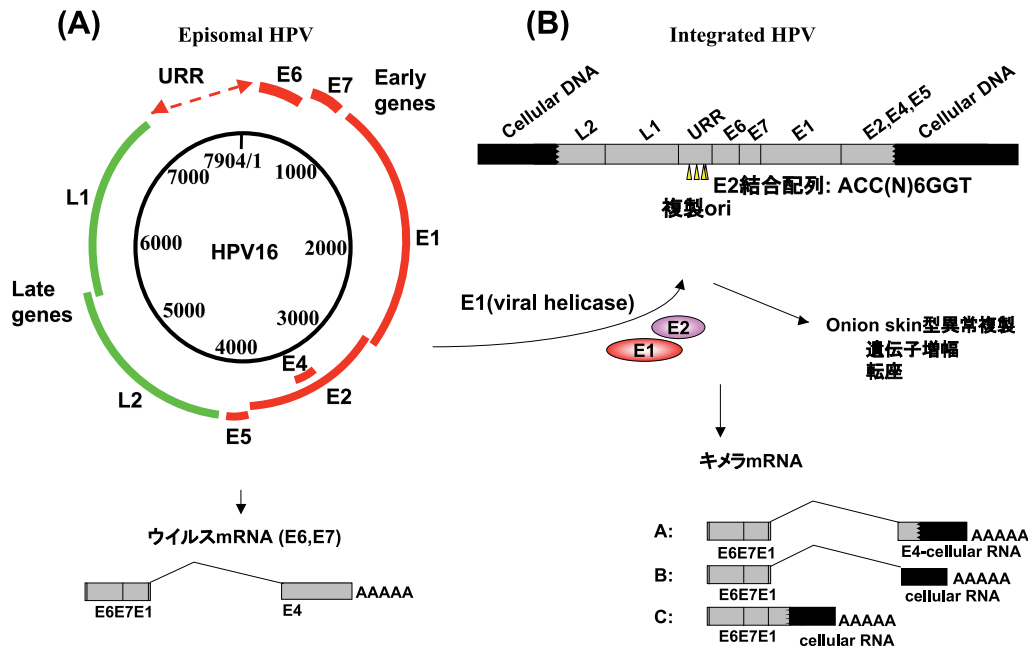


図1 子宮頸がんで見られる HPV ゲノムの染色体への組込み

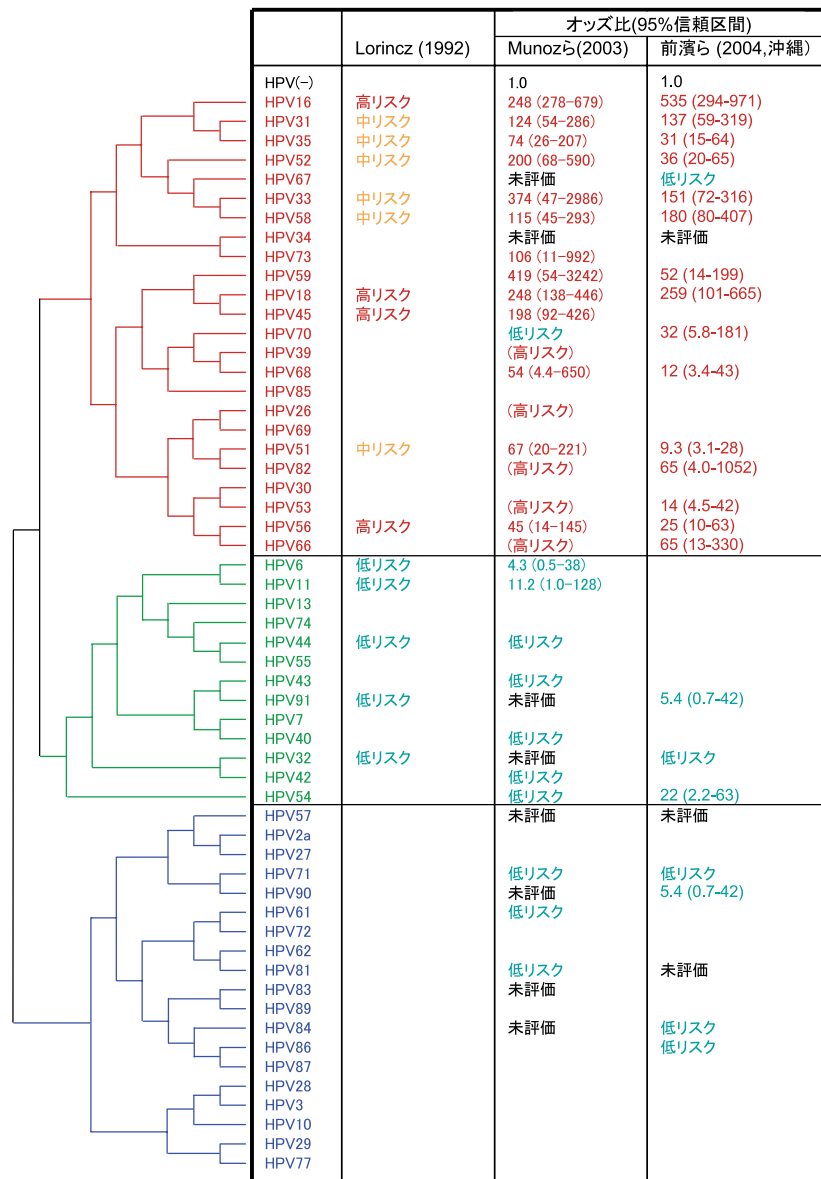
(A) HPV-16 のゲノム構造：パピローマウイルスゲノムは約 8000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA からなる。URR (upstream regulatory region)あるいは LCR (long control region)と呼ばれる領域には複製起点やプロモーターが存在する。初期遺伝子領域にはウイルスの増殖に役割を持つ 6 個の遺伝子 (*E1, E2, E4, E5, E6, E7*) がコードされている。ヘリカーゼである *E1* は *E2* によって複製起点にリクルートされ、環状の 6 量体 2 つを形成すると二本鎖 DNA をほぐすとともに DNA ポリメラーゼ、プライマーゼ、RPA などの複製関連蛋白質群を呼び込んでウイルス DNA の複製を開始する。

(B) HPV の染色体への組込みとその影響：がん細胞から見つかる HPV DNA の組込みパターンには共通の特徴があり、URR と *E6, E7* 遺伝子は保持され、*E2* 遺伝子には欠失変異が見られる。組込まれた HPV DNA 由来の mRNA は A, B, C いずれかのパターンに分けられるが、いずれも *E6* と *E7* のみが発現される。結果的にこのような組込まれ方をした細胞が選択的に増殖してくるためと考えられる。エピゾーマル HPV が同一細胞内に共存すると、ウイルスの複製起点から onion skin 型の過剰複製が起き、近傍領域の増幅や転座などの染色体異常を誘発する。またウイルスプロモーターの変異による転写量の増加やキメラ mRNA の安定性亢進により *E6, E7* が高発現される。

過性に関与している可能性があるが詳細は不明である。性交渉の開始に伴い約 50-80% の女性が HPV 感染を経験するが、通常約 1 年以内にウイルスは排除され、感染により生じた子宮頸部の軽度の異形成・子宮頸部上皮内腫瘍性病変 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) も約 3 年以内に自然消退する⁴⁷⁾。しかし、感染者の約 10% では 3 年以上の持続感染が成立し、さらにその一部から数ヶ月から数十年の経過を経て子宮頸がんが発生すると考えられている^{51, 77)}。現在、子宮頸がんは全世界で女性のがんによる死亡原因の第 2 位に位置しており、年間約 45 万人 (日本国内では年間約 1 万人) が罹患し、そのうち約 1/3 の方が亡くなっている。先進国における子宮頸がんの発生率は主に検診の効果により年々減少傾向にあるが、日本では初交年齢の低下に伴い 20, 30 歳代の若い年齢層での増加傾向が新たな問題となっている。また検診が一般的でない発展途上国においては、子宮頸がんが依然として最も多い女性のがんの死亡原因となっている。残念なことに、アメリカ、イギリスなどでの検診

率が約 70% 以上なのに対し、日本では約 30% 以下と低い水準である。生殖器、口腔、喉咽頭等の上皮に感染する粘膜指向性の高リスク型 HPV は、子宮頸がんの他にも肛門周囲がん、陰茎がん、一部の頭頸部がんからも検出されており、強い因果関係が示唆されている。従って、これら高リスク型 HPV の感染をワクチンにより予防するとともに検診による持続感染病変の早期発見と治療を徹底することは、対がん戦略として極めて重要であり且つ効果的である。

現在、80 カ国以上で承認されている第一世代の HPV ワクチンは、特定の高リスク型 HPV に対するワクチン (Merck 社の対 HPV-6,-11,-16,-18 ワクチン Gardasil, および GlaxoSmithKline 社の対 HPV-16,-18 ワクチン Cervarix) で、海外の大規模臨床試験の約 7 年間の成績では対象となる HPV 感染をほぼ完全に予防している。日本でも申請中で、近く認可される見通しである。これらのワクチンは、HPV の主要キャプシド蛋白 (L1) からなるウイルス様空粒子 (virus-like particle: VLP) を抗原として作製されてお



	Lorincz (1992)	オッズ比(95%信頼区間)	
		Munozら(2003)	前濱ら (2004,沖縄)
HPV(-)		1.0	1.0
HPV16	高リスク	248 (278-679)	535 (294-971)
HPV31	中リスク	124 (54-286)	137 (59-319)
HPV35	中リスク	74 (26-207)	31 (15-64)
HPV52	中リスク	200 (68-590)	36 (20-65)
HPV67		未評価	低リスク
HPV33	中リスク	374 (47-2986)	151 (72-316)
HPV58	中リスク	115 (45-293)	180 (80-407)
HPV34		未評価	未評価
HPV73		106 (11-992)	
HPV59		419 (54-3242)	52 (14-199)
HPV18	高リスク	248 (138-446)	259 (101-665)
HPV45	高リスク	198 (92-426)	
HPV70		低リスク	32 (5.8-181)
HPV39		(高リスク)	
HPV68		54 (4.4-650)	12 (3.4-43)
HPV85		(高リスク)	
HPV26			
HPV69			
HPV51	中リスク	67 (20-221)	9.3 (3.1-28)
HPV82		(高リスク)	65 (4.0-1052)
HPV30			
HPV53		(高リスク)	14 (4.5-42)
HPV56	高リスク	45 (14-145)	25 (10-63)
HPV66		(高リスク)	65 (13-330)
HPV6	低リスク	4.3 (0.5-38)	
HPV11	低リスク	11.2 (1.0-128)	
HPV13			
HPV74			
HPV44	低リスク	低リスク	
HPV55			
HPV43		低リスク	
HPV91	低リスク	未評価	5.4 (0.7-42)
HPV7			
HPV40		低リスク	
HPV32	低リスク	未評価	低リスク
HPV42		低リスク	
HPV54		低リスク	22 (2.2-63)
HPV57		未評価	未評価
HPV2a			
HPV27			
HPV71		低リスク	低リスク
HPV90		未評価	5.4 (0.7-42)
HPV61		低リスク	
HPV72			
HPV62			
HPV81		低リスク	未評価
HPV83		未評価	
HPV89			
HPV84		未評価	低リスク
HPV86			低リスク
HPV87			
HPV28			
HPV3			
HPV10			
HPV29			
HPV77			

図2 α -HPV 属の分子系統樹とリスク分類

パピローマウイルス (PV) は、動物の PV も含め相互に 60-70% の相関性がある α 属から σ 属に分類されている。粘膜型 HPV は α 属に分類される。 α -HPV 属は相関性によりさらに 3 つのサブグループに分けられ、図中では赤、緑、青で区別した。また、ここでは Bethesda システムに基づき前がん病変を記述した。すなわち軽度異形成 CIN1 に対しては LSIL (Low grade squamous intraepithelial lesion)、中等度および高度異形成 CIN2, 3 に対しては HSIL (High grade squamous intraepithelial lesion) とした。

赤字で示した一群の型は分子系統樹上の高リスク型でそのほとんどが子宮頸部の CIN 病変や子宮頸がんで見つかる。緑字で示した一群の型は分子系統樹上の低リスク型。青字で示した一群の型には子宮頸部で見つかる型もあるが主に皮膚病変から見つかる HPV が多く含まれる。右側に疫学調査上のリスク分類を示す。1992 年の Lorincz らはサザンプロット法により LSIL, HSIL, 浸潤がんから 15 の型の HPV を検出し、その頻度から高リスク型(HSIL でもがんでも高頻度、がんでも HSIL より高頻度)、中リスク型 (HSIL でがんより高頻度)、低リスク型 (LSIL で見つかりがんで見つからない) に分類した⁴³⁾。Munoz らは 9 ヶ国から 1918 例の子宮頸がん と 1928 例の対照群とを比較し、高リスク型と低リスク型に分類した。オッズ比が 5 以上で 95% 信頼区間の低値が 3 以上のものを高リスク型と分類した⁴⁸⁾。39 型と 82 型は子宮頸がん数例で検出されたが対照からは 1 例も検出されなかったため高リスク型に分類された。同様に 26,53,66 型は 1-3 例の子宮頸がんのみ検出されたため「高リスクの疑い」に分類された。がんから全く見つからなかった型、1598 例の子宮頸がん中 1 例のみから検出された型 (6,11,81)、オッズ比が 1 以上で 95% 信頼区間の低値が 3 以下のものを低リスク型とした。検出できない型、どのサンプルからも見つからなかった型 (34,57,83) は未評価型として分類された。前濱らは沖縄の 356 人の子宮頸がん と細胞診が正常な 3249 人を対照として同様の定義でリスク分類をした²⁾。ゲノム配列の相関性に基づいた分子系統樹上の分類と疫学的分類が良く一致している。

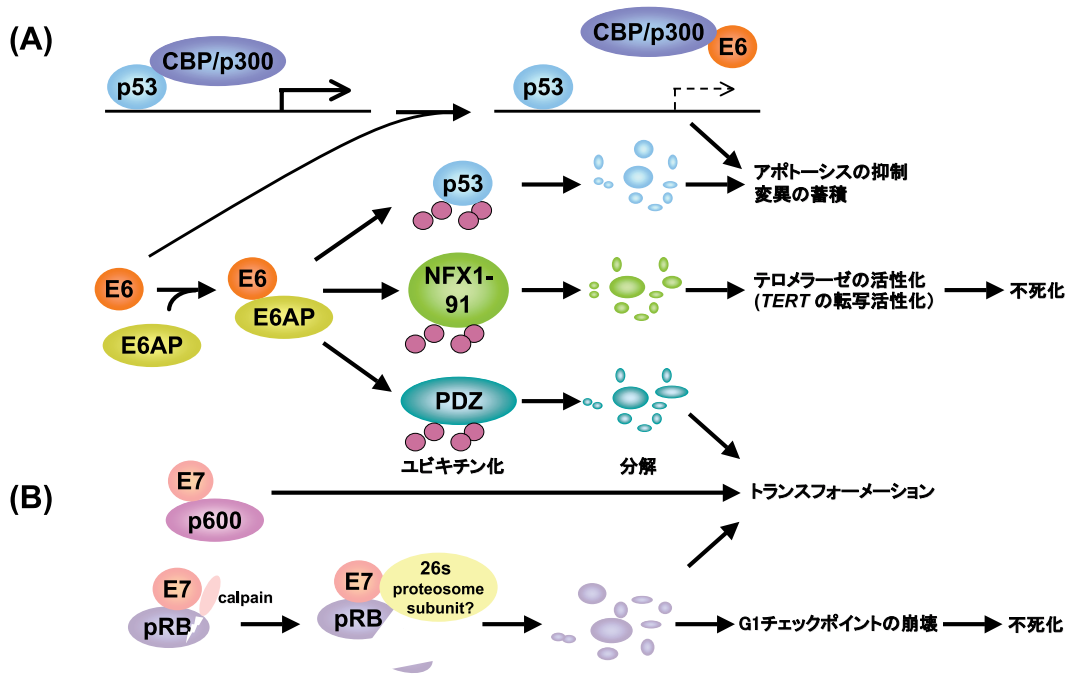


図3 E6 と E7 の主要な標的分子と不活化機構

(A) E6 は細胞の HECT 型ユビキチンリガーゼ (E3) の一つである E6AP と結合し、標的タンパク質との三者複合体を形成する。E6AP の E3 活性により標的蛋白はユビキチン化を受け、プロテオソームに認識され分解される。E6 は E6AP の基質特異性を変えるアダプターとして働き、本来の基質ではない p53 などのユビキチン化と分解を促進する。さらに、E6 は p53 の転写共役因子である CBP/p300 や ADA3 とも結合し、その機能を抑制することで p53 経路をより完全に遮断している。また、E6 は *TERT* プロモーターに対する抑制因子 NFX1-91 の分解を介して *TERT* 遺伝子の発現を誘導し、テロメラーゼを活性化する。E6 は他にも複数の PDZ ドメイン含有タンパク質を標的化し、細胞のトランスフォーメーションを促進している可能性がある。(B) E7 は N 末端の LXCXE モチーフを介して pRB と結合し、pRB を不活化する。また、高リスク型 HPV の E7 は pRB の分解も促進することが知られている。この分解反応は二つのステップからなり、第一段階は calpain に依存する。E7-calpain 複合体は pRB と結合し、calpain により C 末端 802-928 が切断される。さらに E7 は切断を受けた pRB (1-801) 断片のプロテオソームによる分解を促進する。また、E7 は CR1 を介して p600 と相互作用し、pRB の不活化とは独立してトランスフォーメーションを引き起こす。

り、ウイルス中和抗体を誘導して感染を防ぐ働きがある。既感染者には無効であるため性交渉開始前の女性への接種が基本となるが、これら第一世代 HPV ワクチンの現プロトコル (0, 2, 6 ヶ月の 3 回接種) でのより長期間に渡る有効性は不明である。また、型特異性が高く HPV-16,-18 の感染による子宮頸がん (世界的には約 70%, 日本では約 60% 以下) には効果が期待できるが、その他の型の HPV 感染に対しては効果が弱いか全くない。コスト面での課題をクリアし、たとえ現行ワクチンの接種率が 100% になったとしても、接種プロトコルの最適化、より広範囲の高リスク型ウイルスに対して中和活性を持つ第二世代 HPV ワクチンの開発^{34, 38)}、検診率の向上やより良いスクリーニングシステムの確立が必要なのは言うまでもない。従って、HPV 感染ならびに発がんの自然史やウイルス蛋白の機能に関する分子基盤の全容解明を目指すことは、次世代の HPV ワクチン開発とこれを用いた感染予防のみならず新たな治療法を打ち立てるためにも極めて重要である。本稿では、

E6, E7 の機能と HPV 被感染細胞が子宮頸がんへと進行する分子機構について最近の知見を紹介したい。

1. HPV の構造と生活環

HPV ゲノムは複製起点やプロモーター配列を含む URR (upstream regulatory region) と呼ばれる制御領域、初期遺伝子領域 (early region)、後期遺伝子領域 (late region) より構成されており、全ての遺伝子は片方の DNA 鎖 (センス鎖) 上に存在している (図 1A)。初期遺伝子領域にはウイルスの増殖に役割を持つ 6 個の遺伝子 (*E1, E2, E4, E5, E6, E7*)、後期遺伝子領域にはウイルスキャプシド蛋白 (*L1, L2*) がコードされている。初期遺伝子は URR にある *P97* プロモーターによって、後期遺伝子は *E7* 遺伝子領域に位置する *P670* プロモーターによってドライブされると考えられている。E1 と E2 はウイルスゲノムの複製や分配において重要な役割を果たしている。E2 は転写因子であり、URR 内に複数存在する E2 認識配列への結合を介し

てウイルス遺伝子の転写制御を行っている。複製起点はこの E2 結合配列の近傍に位置し、E2 はヘリカーゼである E1 を複製起点にリクルートする機能も有している。複製起点に結合した E1 は二本鎖 DNA をほぐすとともに宿主細胞に由来する DNA ポリメラーゼ、プライマーゼ、RPA などの複製関連蛋白質群を呼び込んでウイルス DNA の複製を開始させる。また、ウシパピローマウイルスの例では、E2 は宿主蛋白質である Brd4 との相互作用を介してウイルス DNA を細胞分裂時の宿主紡錘体に繋ぎ止め、分配に関与することが分かっている⁸⁰⁾。E4 は E1/E4 融合蛋白質として発現し、ケラチンとの結合により細胞骨格を崩壊させウイルス増殖を促進していると考えられている。E5 は、EGF 受容体の活性化を増進し、培養細胞をトランスフォームすることが知られているが、ウイルスの生活環における意義は明らかでない。E6 と E7 は基底細胞より上層の最終分化に向かう細胞の DNA 合成能を維持させ、ウイルス DNA の複製を可能にしている。

HPV は重層扁平上皮組織の中で唯一分裂能を有する基底細胞に感染しなければ感染巣を形成できない。そのため、物理的に傷ついた粘膜あるいは皮膚から侵入する必要があると考えられているが、子宮頸部では重層扁平上皮から単層円柱上皮へ移行する SCJ (squamo-columnar junction) あるいは TZ (transforming zone) と呼ばれる境界領域が物理的な刺激に弱く、解剖学的にも HPV 感染の格好の標的となる素地を持っている。感染リセプターとして $\alpha 6$ インテグリン、ヘパラン硫酸糖蛋白などが示唆されているが、基底細胞への標的化機構の詳細は不明である。基底細胞層には上皮幹細胞と、その分裂により生じさらに数回分裂可能な TA (transit amplifying) 細胞が存在する。感染を受けた基底細胞では 50-100 コピー程度のウイルスゲノムが核内エピゾームとして複製維持され、潜伏感染状態となる。おそらく、上皮幹細胞に感染が成立することにより、ウイルスは長期にわたって潜伏可能となる。この感染を受けた基底細胞内では、E6 と E7 を含めたウイルス遺伝子発現は低く保たれており、細胞傷害性もない。なお、感染成立後、50-100 コピーにまで増幅する機構は解明されていない。宿主細胞が上層へと移行し分化するのに伴ってウイルス遺伝子発現が増加し、数百倍から数千倍といったウイルス DNA の爆発的複製が起こる。しかしながら分化細胞は既に細胞周期を逸脱しているため、DNA 合成 (S) 期を持たない。これに対して DNA ポリメラーゼなどの複製関連蛋白質を宿主に依存しているウイルスは、宿主細胞の細胞周期を攪乱し DNA 合成期を強制的に確保していると考えられている。このウイルスの戦略は DNA 腫瘍ウイルスに限らず多くの DNA ウイルスで報告されてきている。複製関連蛋白質の多くは E2F によって正に制御される。そこで E7 は pRB の不活化によって、pRB と E2F の複合体から E2F を遊離させ、複製関連蛋白質の発現を転写レベルで誘導しているのである。

E2F の標的遺伝子としては他に $p14^{ARF}$ がある。 $p14^{ARF}$ は HDM2 と結合することで p53 の分解を抑制する活性を持っており、pRB 経路と p53 経路をつないで異常な細胞増殖シグナルを抑制する安全弁の役割を担っている。すなわち、E7 による pRB の不活化を介した E2F の構成的活性化は、 $p14^{ARF}$ の過剰誘導を招き p53 の蓄積・活性化を引き起こすのである^{7, 73)}。その活性化レベルが高いと細胞はアポトーシスに陥ってしまう。高リスク型 HPV の E6 は E3 ユビキチンリガーゼである E6AP (UBE3A) と結合し、E6AP の基質特異性を変えるアダプターとして働き、p53 のユビキチン化と分解を促進する。この p53 分解機構は pRB の不活化活性の高い高リスク型 HPV でのみ保存されている。また、E6 は p53 の転写共役因子である CBP/p300 や ADA3⁴¹⁾ と結合し、その機能を抑制することで p53 経路を二重に遮断している。このほかにも、E6 はアポトーシス誘導に関与する Bak⁶⁸⁾、FADD^{24, 70)}、pro-caspase8^{23, 26)} と結合し、これらの働きを阻害することが知られている。このうち、CBP/p300 や Bak との結合は高リスク型 HPV 以外にも保持しているものがある。また、E6 を持たないパピローマウイルスも存在することから、本来 E6 は E7 による pRB 不活化が惹起するアポトーシスを抑制する役割を担って E7 の機能強化に伴い進化したと筆者らは推測している。E6 と E7 の働きにより最終分化に向かう細胞でウイルス DNA 複製が行われるとともに、宿主の分化特異的転写因子により後期遺伝子プロモーター *P670* が活性化し^{39, 40)}、キャプシド蛋白の発現が誘導される。次にウイルス DNA がキャプシド蛋白によって包み込まれウイルス粒子形成が起こり、最上層の最終分化細胞と共に剥離・脱落する。このように、普段は上皮組織内に留まり、抗原性の高いウイルス粒子は血管のある真皮からより離れた表層部で初めて形成されるという特異な生活環を有している。従って、ウイルス血症にはならず免疫学的にも排除されにくいいため、HPV は長期間生活環を維持することができる。また、子宮頸部における高リスク型 HPV のウイルス粒子形成は皮膚型の HPV に比べ遙かに少ない。HPV16/18 感染による皮膚病変ではウイルス粒子形成が多い。これらの情報から筆者らは以下のように考えている。高リスク型 HPV はウイルス粒子形成の少ない子宮頸部で長期間病変を維持し、性行為という宿主の種の保存に必須で且つ最も濃密な接触行為を介して少ないウイルス粒子を効率的にペニスや皮膚に感染させる。感染期間は短いもののウイルス粒子産生量の多い男性を介して新たな女性に感染を広げるという戦略によって高リスク型 HPV は現在の繁栄を築いたのではないだろうか。

2. E6 の新たな機能

(1) テロメラーゼの活性化

体細胞においてテロメラーゼ活性は、テロメラーゼを構成する逆転写酵素サブユニット (telomerase reverse

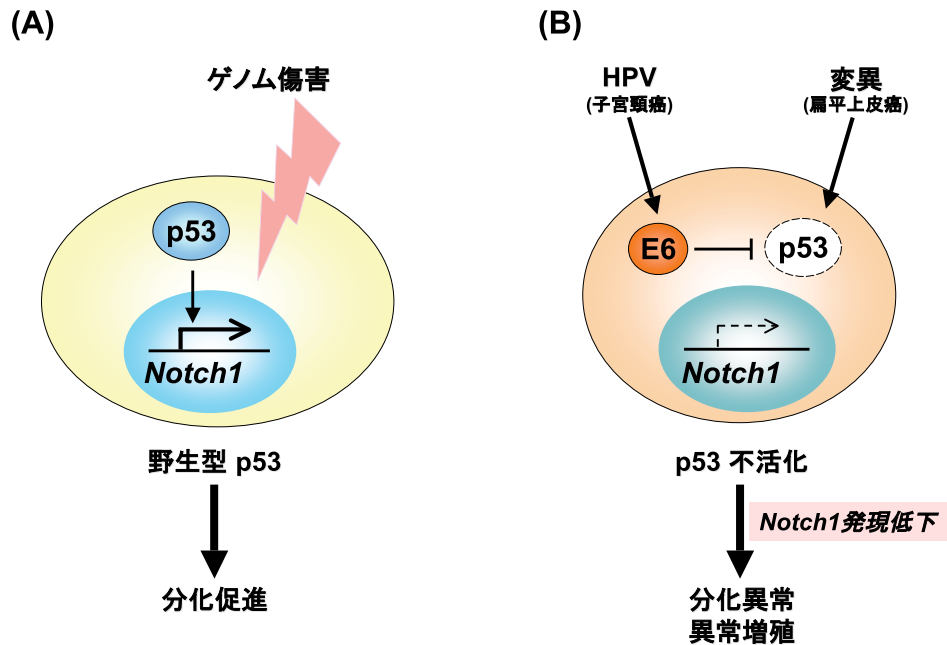


図4 Notch1 下方制御の持つ生物学的意義

(A) 正常上皮角化細胞にゲノム傷害がもたらされると、p53はNotch1遺伝子発現を活性化し分化を誘導する。すなわち、p53は分化促進によってゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系列から排除することができる。このp53の分化促進機能は重層扁平上皮組織における新たなゲノム監視機構として働いている可能性がある。

(B) HPVによる子宮頸がん発症においては、高発現するE6によってp53の不活化と同時にNotch1がん抑制遺伝子の発現が抑制されており、細胞は分化に対する抵抗性と異常増殖能を獲得すると考えられる。このNotch1の下方制御は、E6による分化抑制能を説明する一つの機序であろう。また、子宮頸がん以外の上皮がんにおいてもp53の変異がNotch1がん抑制遺伝子の不活化を介して発がんを促進している可能性がある。

transcriptase: TERT) の発現に依存している。テロメラーゼのもう一つの構成因子である鋳型RNAコンポーネント (TR: 遺伝子名はTERC) がほとんど全ての細胞で発現しているのに対し、TERTは幹細胞などごく一部の細胞でしか発現しておらず、多くの体細胞ではテロメア末端の一定以上の短縮に伴い細胞老化がおとずれ増殖停止する。また、ヒトがんにおいてテロメラーゼの活性化は、p53経路またはpRB経路の異常と並んで最も共通(約85%)に見られる変化であることが示されている。通常の培養条件においてヒト正常子宮頸部角化細胞の不死化には、少なくともpRB経路の不活化とテロメラーゼの活性化が必要である。HPVによる不死化では、pRB経路の不活化はE7が、テロメラーゼの活性化はE6がそれぞれ担っている³⁶⁾。NFX1-91はTERTプロモーター上にmSin3A/HDAC複合体を呼び込んで転写抑制に働く因子である⁷⁹⁾。E6はこのNFX1-91をE6AP依存的に分解促進することで転写抑制を解除することが示されている²⁷⁾(図3)。TERTプロモーターやイントロンには多数のMyc認識配列であるE-boxがあり、転写抑制が解除された結果、Myc/MaxのE-boxへの結合が促進されTERT遺伝子の転写活性化が起こる。この過程にはさらにE6とc-mycの複合体形成や⁷²⁾、E6によるc-myc誘導⁴⁵⁾なども提唱されている。また、E6発現

細胞において、NFX1の別のスプライスバリエントであるNFX1-123とpoly(A)結合蛋白がTERT遺伝子の発現を亢進することも報告されている³⁵⁾。がん化においてTERTの発現誘導は、テロメア長の維持により不死化の必要条件の1つを満たすが、ウイルス学的には1つの被感染細胞から肉眼病変を形成し長期間維持するために有利に働く可能性と、テロメア長非依存的に細胞増殖を活性化する可能性が考えられる。

(2) p53の不活化とNotch1の下方制御

E6は単独で上皮角化細胞の分化を抑制する活性を有しているが、その分子基盤は未解明であった。近年、皮膚などの重層扁平上皮組織においては、Notch1が角化細胞の分化誘導因子であり⁶²⁾、がん抑制遺伝子として機能することが示唆されている⁵⁵⁾。正常子宮頸部では比較的高レベルに検出されるNotch1の発現は低分化型や悪性度の高い子宮頸がんでは低下しており、活性型のNotch1を子宮頸がん由来の細胞株に導入するとE6、E7遺伝子の転写抑制を介して細胞増殖を抑制することが報告されている⁶⁷⁾。しかしながら、Notch1の発現低下をもたらす分子機構は不明であった。これに関し、筆者らはE6がp53の不活化を介してNotch1の発現を抑制していることを発見し、p53の新規標

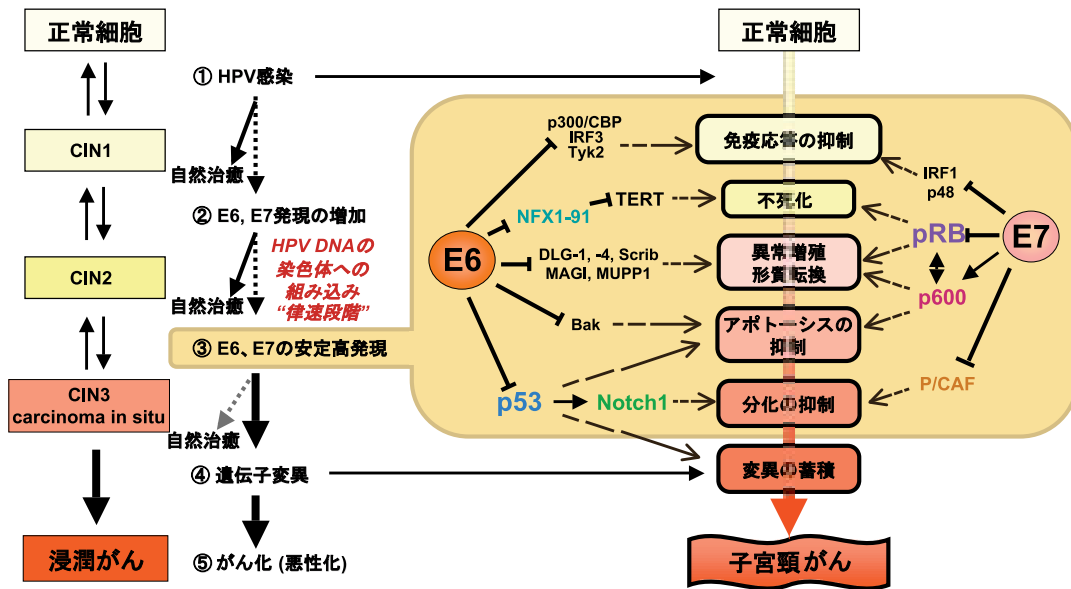


図5 HPVによる子宮頸がんの発生機構

大部分のHPV感染は宿主の免疫応答により排除され自然治癒するが、持続感染が成立するとCIN1（微細な異形成）より先に進行する。HPVゲノムDNAの染色体への組み込みとE2の欠失変異により基底細胞におけるE6とE7の発現が増加すると、その細胞は免疫応答の抑制・不死化・形質転換・アポトーシスの抑制・分化の抑制といったがん化に必要な多くのステップを一度に踏破しCIN2（中等度異形成）からCIN3（高度異形成）へと進行する。CIN2からCIN3への進行に伴い、E6とE7を高発現する基底細胞に由来する細胞は分化層（傍基底細胞層や有棘細胞層）でも分裂像を示すようになる。このE6, E7高発現細胞の出現が、がん化における律速段階となっていると推察される。pRBとp53が不活化しテロメラーゼ活性をもつことで細胞が不死化し異常増殖を行う間に、染色体不安定性による遺伝子変異の蓄積が起き、増殖優位性を獲得したクローナルながん細胞集団が出現すると考えられる。

的遺伝子としてNotch1遺伝子を同定した⁸¹⁾。さらに、このp53 - Notch1経路は、角化細胞においてゲノム傷害誘導時に活性化し、分化を促進することが分かった。すなわち、p53はNotch1遺伝子の発現誘導を介した角化細胞の最終分化誘導によってゲノムに傷害を受けた細胞を増殖系列から排除するというがん抑制機序をも有している可能性がある（図4）。HPVによる子宮頸がん発症においては、E6によってp53の分解が促進されると同時にNotch1がん抑制遺伝子の発現が抑制されており、E6によるNotch1下方制御を介した分化抑制が発がんに関与していると推測される。しかし、ウイルスの生活環におけるNotch1下方制御の意義は未解明のままである。

一方で、子宮頸部における扁平上皮化生や異形成、高分化型のがんではNotch1の高発現が観察されており、またNotch1の活性化は（機序は明らかでないが）PI3K - Akt経路の活性化を導くことで子宮頸がんの発生に貢献するという報告もあり⁷¹⁾、二面性を呈しているNotch1の生物活性に関しては今後詳細な検討が必要である。同時に、子宮頸がん以外の上皮がんにおいてもp53の変異がNotch1がん抑制遺伝子の不活化を介して発がんを促進する可能性もあり、さらなる解析を行う必要がある。

また、ErbB2の蛋白発現レベルがp53によって負に制御されている可能性があり、E6はp53の不活化を介してErbB2の蓄積を引き起こし、細胞増殖能を亢進させていることが示された⁵⁰⁾。p53の不活化は、実に様々な生物学的帰結をもたらしている。

(3) 複数のPDZドメイン含有タンパク質の標的化

E6とE7は、それぞれ齧歯類株化細胞をトランスフォームし造腫瘍性を与えることが知られている。子宮頸がんから分離される高リスク型HPVのE6タンパク質のC末端には全てクラスIのPDZドメイン結合モチーフ(X-S/T-X-V/L/I；X：任意のアミノ酸、S/T：セリンまたはスレオニン、V/L/I：バリン、ロイシン、またはイソロイシン)が保存されており、トランスフォーミング活性およびヌードマウスでの腫瘍原性に必須である³⁷⁾。また、E6トランスジェニックマウスにおける皮膚の過形成誘導は、このPDZドメイン結合モチーフに依存している^{54, 64)}。これまでに、DLG1, DLG4, Scrib, MAGI-1, -2, -3, MUPP1, PATJなどのPDZドメイン含有タンパク質が、E6と結合し分解促進される標的タンパク質候補として報告されている²⁹⁾。これらのタンパク質群は細胞極性の維持やtight junction, GAP junctionなどの細胞間接着装置の形成とそこからの

増殖抑制シグナルの伝達などに関わっていると考えられており、E6による分解促進は上皮-間葉転換を誘導し、トランスフォーメーションを引き起こす可能性がある。また最近、E6の標的分子の一つであるPTPN13フォスファターゼの重要性がマウス細胞系を用いて示された⁶⁵⁾。しかしながら、いずれの標的分子についても、その子宮頸がん発生における生物学的意義は未解明である。

3. E7の新たな機能

(1) p600との相互作用

E7のN末端側にはSV40の大型T抗原やアデノウイルスのE1Aにも保存された領域CR1とCR2がある。CR2にはLXCXE(L:ロイシン, X:任意のアミノ酸, C:システイン, E:グルタミン酸)モチーフがあり、これを介してpRBファミリータンパク質に結合し不活化している。高リスク型HPVのE7はpRBとの結合能が高く、且つその分解をも促進することが知られている。この分解反応は2つのステップからなることが報告された¹⁴⁾。まずE7は μ -カルパインとpRBの双方への結合を介してカルパインによるpRBの切断を促進し、次に切断されたpRB(1-801)がE7によってプロテオソーム依存的に分解促進される(図3)。E7と結合できない変異を持つが機能的には問題ないpRBのノックインマウスとE7トランスジェニックマウスを掛け合わせると、E7により引き起こされた異常がほとんど見られなくなることから、E7の生物活性の大部分はpRB機能の不活化に依存していると考えられる⁴⁾。近年、E7はCR1を介してp600と相互作用することが示された³¹⁾。pRBファミリータンパク質と結合できるがp600と結合できないE7変異体ではトランスフォーミング活性が失われていること、逆にpRBと結合しないウシパピローウイルスE7にはトランスフォーミング活性が備わっており、この活性はp600との結合に依存している¹⁵⁾。また子宮頸がん細胞株においてp600をRNAiによってノックダウンすると足場非依存性の増殖が阻害されることから、p600との相互作用はE7のトランスフォーメーション能にとって必須な役割を持つことが示唆される。これはpRB機能の不活化に依存しないE7の生物活性の重要性を示唆している。しかし、E7がp600の機能をいかに修飾しているのかに関しては今後の課題である。

(2) 新規標的因子群

E7の主要な標的であるpRBは、P/CAFアセチル・トランスフェラーゼによってアセチル化を受け、細胞周期からの離脱と細胞分化に機能することが示されている⁵³⁾。E7は、このP/CAFと相互作用し活性を阻害することが報告されており³⁾、pRBの不活化と合わせて、角化細胞の分化抑制につながる可能性がある。また、P/CAFはp53の転写共役因子としても機能することから、P/CAFの不活化は間

接的に前述のp53による分化誘導経路を阻害する可能性もある。

E7は他にもpRBファミリータンパク質の不活化やPP2Aとの結合・機能抑制を介してAktの活性化を誘導する^{46,61)}。また、アポトーシスや細胞老化の阻害に働くDEK遺伝子の発現を亢進したり⁷⁶⁾、PMLと相互作用してPMLによる細胞老化を回避する機能⁹⁾も有しており、これらの活性はE7によるトランスフォーメーションに関与している可能性がある。

4. E6, E7による染色体不安定性の誘導

染色体不安定性に由来する細胞性遺伝子異常の蓄積は多くのがん発生において重要な機構である。E6, E7は、それぞれ独立した機構で短期間に染色体不安定性を誘導することが知られている²⁰⁾。

詳細な機構は不明だが、E7によるサイクリンA, E/CDK2の制御を介して、中心体の過剰複製(over-duplication)が生じる^{17,18)}。これにより、有糸分裂時に複数の紡錘体極が形成される。また、E6によってG2/Mチェックポイントが無効化されるため、複数の紡錘体極形成による染色体の分配異常を伴ったまま細胞質分裂が進行し、異数体が発現する。また、これも詳細な機構は不明だが、E6, E7発現細胞においてDNA損傷が蓄積した状態で細胞周期が進行すると、分裂後期に染色体(おそらく染色体末端部)間で橋状構造(anaphase bridge)が形成され、架橋-DNA切断-融合(bridge-breakage-fusion)サイクルが反復されることによって染色体の構造異常が引き起こされる¹⁹⁾。これらの機序を介して、E6, E7による染色体不安定性が誘導され、染色体異常がもたらされる。他にも、E6, E7によって、Aurora A, Plk1, SurvivinといったG2/M期タンパク質群の高発現が観察されており⁵⁷⁾、染色体の不安定化に関与している可能性がある。

5. E6, E7の高発現に至る機構

(1) 持続感染状態の成立

前述した通りHPVはその生活環においてウイルス血症を起こさず、また宿主の細胞死を誘導しないことから炎症反応も惹起されない。従って、免疫監視機構が働きにくく、感染が持続しやすい。それでも、あらたなHPV感染の多くは宿主の免疫応答により1年以内に排除され自然治癒する。しかし、一部の症例では、持続感染状態が長期的に持続する(図5)。その理由の一つとして、E6とE7には宿主免疫監視機構による捕捉から積極的に回避する活性があることが挙げられる。特にE6とE7はインターフェロン(IFN)応答性遺伝子群の発現を抑制することで自然免疫応答を阻害する働きが備わっている。E6とE7はそれぞれIRF3, IRF1と結合し、その転写活性化能を阻害することでIFN- β プロモーターの活性化を妨げる^{56,63)}。E6はま

た Tyk2 と⁴²⁾, E7 は p48 と結合して IFN- α からのシグナルをブロックする^{5, 6)}. IFN シグナルは自然免疫にとって重要であり, 適応免疫の活性化を導く役割があることから, E6 と E7 は結果的に適応免疫応答を遅らせ持続感染状況を構築していると考えられる. 従って, 宿主免疫とのせめぎ合いを乗り越え E6 と E7 を安定発現する段階に入った前がん細胞は, より存続し続けることになる. すなわち, 異形成が宿主の免疫機構によって排除されるより早く, 何らかの理由で E6 と E7 を高発現する細胞が出現することが, がん化にとって必須であり且つ律速段階となっていると推察される. 感染期間が長くなればなるほど, E6 と E7 を高発現する細胞が出現する確率は高くなる.

(2) ウイルス DNA の宿主染色体への組込みと E2 の消失

E6 と E7 を高発現しているがん細胞では, E2 の発現消失, E6E7 プロモーター (P97 プロモーター) の変異, ウイルス DNA の染色体への組込みや増幅などが見られる. このウイルス DNA の染色体上の組込み位置に関して, 後述するように *c-myc* 近傍に組込まれ遺伝子増幅したと思われる例が報告されている²²⁾. しかしながら, 多くの組込みはゲノム全域で起きておりホットスポットはなく, 挿入変異の証拠も見つかっていない. がん細胞から見つかる HPV ゲノムの組込みパターンには共通の特徴がある (図 1B). E6, E7 遺伝子とその P97 プロモーターは必ず存在し, 同じプロモーターから転写される E2 遺伝子には必ず欠失変異が見つかる. 従って, 組込み後の主要ウイルス転写産物は E6 と E7 をコードし, 3'-非翻訳領域は細胞性遺伝子由来となり, 多く場合 mRNA の安定性が増すことが知られている. また, P97 プロモーター内には転写抑制因子である YY1 の認識配列が存在するが, ここに変異や欠損が見られることもあり, プロモーターの活性化に貢献している. E2 はウイルス遺伝子の発現を制御する転写因子であり, 少なくとも染色体に組込まれた E6E7 プロモーターに対しては抑制的に働くことが既に知られており, Brd4 がこの転写抑制における共役因子として機能することが最近明らかになった⁷⁸⁾. さらに, E2 は E6²⁸⁾, E7²⁵⁾ との直接結合を介してこれらの機能を阻害することも報告された. E2 遺伝子を子宮頸がん細胞株に再発現させると増殖阻害が誘導されることから, E2 の発現消失と E6, E7 の安定高発現はがん化への進行のみならずがん形質の維持に必要であることが示される^{59, 60, 77)}. このような E6, E7 の安定高発現をもたらす偶発的な染色体への組込みイベントががん化における実質的な律速段階となっており, 一旦 E6, E7 の安定高発現細胞が出現すると, その後のステップはかなりの確率で進行していく可能性がある. 従って, 染色体への“組込まれ易さ”が宿主側のリスク因子となり得る. これに関し DNA の二本鎖切断の誘導が, DNA の組込みイベントの起こる可能性を高めるという考え方があり⁵⁹⁾. これはがんで見られる

HPV DNA の組込み位置が染色体脆弱部位 (common fragile site : DNA 切断が起りやすく転座や欠失が良く見られる部位) に多いという観察事実に基づいている^{69, 74)}. 実際, 非相同組換え修復酵素である Ku70 の発現を抑えることで二本鎖切断部位を増やした場合, HPV DNA の新規組込みイベントが増加することが *in vitro* 培養細胞系を用いて実験的に確かめられている⁷⁵⁾. また, HPV ゲノムの組込み初期にはエピゾーマル HPV DNA も同一細胞内に共存すると考えられる. このエピゾーマル HPV DNA から供給される E1 と E2 は, 染色体に組込まれた E6E7 プロモーター領域にある複製起点に働き onion skin 型の過剰複製をもたらす可能性がある³³⁾ (図 1B). このような細胞では, E6, E7 遺伝子とその近傍領域の増幅や転座などのゲノム異常が起きる一方, その程度に応じてアポトーシスが誘導されると考えられる. 実際に HeLa 細胞の染色体を詳細に解析すると *c-myc* 近傍に組込まれた 8q24 領域の HPV18 ゲノムが *c-myc* とともに増幅し, 増幅領域の転座が複数回にわたって起きていることが推定される⁴⁴⁾. 一方で SiHa 細胞のように HPV16 DNA が 1 コピーのみ組込まれているがん細胞株もある. 実際の子宮頸がんの臨床サンプルでは組み込まれた HPV DNA とエピゾーマル HPV の両方が検出されることが多い. しかし, 検出されるエピゾーマル HPV が周辺の前がん病変からの混入である可能性は否定できない. 一方, CaSki 細胞には E1, E2 の ORF が残っており, mRNA も検出されることが知られている. また, これまでに樹立されている子宮頸がん細胞株に存在する HPV 型は 16 (CaSki, SiHa, SKGIIIb, QG-U など), 18 (HeLa, C4-1) がほとんどで他の型としては 68 型 (ME180) が知られているのみである. 一方, HPV 陰性の子宮頸がん細胞株は C33A, Yumoto, OMC4 などが知られている. HPV 陰性の子宮頸がんは株化されやすい可能性もあるものの, HPV16/18 以外はかなり頻度でエピゾーマル HPV のみでがん化しており, 株化の際に HPV が抜けると同時に *p53* に変異のある細胞のみが選択された可能性も十分考えられる. E6, E7 の発現が維持されればエピゾーマル HPV の有無は基本的にはどちらでも良いのかも知れない. いったん E6 と E7 が高発現すると, 前述した機序により染色体不安定性が短期間に誘導され細胞性遺伝子の変異が蓄積し, がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活化などにより増殖優位性を獲得したクローナルな細胞集団が出現し, がん化が進行すると推測される (図 5). 実際にヒト正常角化細胞に子宮頸がんが発現している程度の E6 と E7 を発現させ三次元培養すると, 高度異形成に準ずる組織像が得られる.

HPV トランスジェニックマウスを用いた子宮頸がんモデルの解析から, 重層扁平上皮組織の基底細胞における E6, E7 の発現に加えエストロゲンが子宮頸がんの発生と悪性化に寄与していることが示された¹¹⁾. また, 臨床サンプルの

疫学的解析から正常組織や前がん病変では見られなかったアロマトラーゼ（アンドロゲンをエストロゲンに変換する酵素）の発現が約35%の子宮頸がんにおいて見られており、このアロマトラーゼの発現誘導はエストロゲン受容体の発現亢進と相関することが分かった⁴⁹⁾。さらに、HPV陽性子宮頸がん由来細胞に対して特異的に、外来導入したアロマトラーゼがエストロゲン受容体の発現とE6, E7の高発現の誘導ならびに足場非依存的な細胞増殖能の亢進を引き起こすことが示された。一方、BRCA1はエストロゲン受容体遺伝子発現に抑制的に働くことが知られているが、E6とE7はBRCA1と直接結合しこの転写抑制を解除することができる⁸³⁾。これらのことから、アロマトラーゼの発現誘導とエストロゲン刺激がE6, E7の発現と協調して子宮頸がんの進行におけるリスク因子となっていることが示唆される。

おわりに

E6, E7の安定高発現はがん化における必要条件であるが十分条件ではない。これまでに、子宮頸がん細胞において*H-ras*の変異¹⁾、*c-myc*^{30, 44, 58)}、*PIK3CA*⁸⁾、*ErbB2*⁸²⁾、*cIAP1*³²⁾の増幅、*PTEN*²⁾、*TSLC1*⁶⁶⁾の発現低下といったいくつかの遺伝子変化が見出されており、がん化における関与が示唆されている。子宮頸がんの発生に関与する遺伝子変化を同定するため、子宮頸部由来の正常細胞をもとに、E6, E7をはじめがん化との関連が指摘されている種々の遺伝子を導入し腫瘍原性を評価する必要がある。これに関し、最近筆者らは正常子宮頸部由来の角化細胞に対し、E6, E7に加えさらに*H-ras*変異体など1-2個のがん遺伝子を導入するだけで、造腫瘍能が誘導されることを観察している⁵²⁾。従って、一旦E6とE7が安定に高発現するようになったCIN3病変ががん化する過程は予想以上に短期間である可能性がある。しかしながら、これら細胞性遺伝子の変化は、実はE6とE7による染色体不安定性の結果促進され*in vivo*で選択されたものと考えられることから、E6, E7は子宮頸がん発生において事実上唯一の原因と捉えることができる。この点において、E6, E7の安定高発現をもたらす最大の原因であるHPVゲノムDNAの染色体への組込みは、HPV感染後、発がん過程における律速段階であると考えられ、今後詳細な機構解析が必要である。染色体への組込み時期は高度異形成への進展時とはほぼ一致していることから、染色体内に組込まれたHPV DNAを効率に検出することは信頼性の高いスクリーニングシステムを確立する上で有効なものとなり得る。また、E7によるpRBの不活化はCDK阻害因子であるp16^{INK4a}の蓄積を許容出来るため、p16^{INK4a}の高発現はE7の高発現を反映しており、CIN3や浸潤がんの良いマーカーとなることが示されている。このp16^{INK4a}レベルを指標にしたスクリーニングを組み合わせるのも信頼度を向上させる有効な手段である。がん細胞はたとえエピゾーマルHPVを維持していたとして

も最終分化は抑制されており、新たなウイルス粒子産生は起こっていない。このため現状の感染予防HPVワクチンには治療効果はない。一方、がん細胞中ではE6, E7遺伝子が構成的に発現しており、発がんおよびがん形質の維持に重要な役割を果たしている^{51, 84)}。すなわち、E6とE7は発がんにおける責任遺伝子であり、がん特異抗原であるE6とE7に対する標的治療の有効性に関しては理論上疑いの余地が無い。この治療法はE6とE7を高発現する前がん病変に対しても効果を期待できる。具体的には、キャプシド蛋白にE6, E7の一部を組み入れたキメラVLPを用いた治療用ワクチンが考案され¹³⁾、現在臨床試験が進行中である。このワクチンによる細胞免疫の活性化を基にした方法論が、実際有効であるか否か検討結果が待たれる。また、より直接的な方法としてsiRNAによりE6とE7の発現抑制を行う治療法が有望であるが、siRNAの*in vivo*導入システムの確立が乗り越えなければならない大きな壁である。従って、E6とE7の機能の詳細を明らかにし、その標的分子と働きを知った上で、細胞機能を調節する方法論も視野に入れていく必要がある。

文献

- 1) Alonio LV, Picconi MA, Dalbert D, Mural J, Bartt O, Bazan G, Dominguez M, Teyssie AR. Ha-ras oncogene mutation associated to progression of papillomavirus induced lesions of uterine cervix. *J Clin Virol* 27: 263-269, 2003.
- 2) Asato T, Maehama T, Nagai Y, Kanazawa K, Uezato H, Kariya K. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 189: 1829-1832, 2004.
- 3) Avvakumov N, Torchia J, Mymryk JS. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. *Oncogene* 22: 3833-3841, 2003.
- 4) Balsitis S, Dick F, Lee D, Farrell L, Hyde RK, Griep AE, Dyson N, Lambert PF. Examination of the pRb-dependent and pRb-independent functions of E7 *in vivo*. *J Virol* 79: 11392-11402, 2005.
- 5) Barnard P, McMillan NA. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. *Virology* 259: 305-313, 1999.
- 6) Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. *Virology* 277: 411-419, 2000.
- 7) Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395: 124-125, 1998.
- 8) Bertelsen BI, Steine SJ, Sandvei R, Molven A, Laerum OD. Molecular analysis of the PI3K-AKT pathway in uterine cervical neoplasia: frequent PIK3CA amplification and AKT phosphorylation. *Int J Cancer* 118: 1877-1883, 2006.
- 9) Bischof O, Nacerddine K, Dejean A. Human papillo-

- mavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Mol Cell Biol* 25: 1013-1024, 2005.
- 10) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *Embo J* 3: 1151-1157, 1984.
 - 11) Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2490-2495, 2005.
 - 12) Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK, Wong YF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol* 93: 621-627, 2004.
 - 13) Da Silva DM, Eiben GL, Fausch SC, Wakabayashi MT, Rudolf MP, Velders MP, Kast WM. Cervical cancer vaccines: emerging concepts and developments. *J Cell Physiol* 186: 169-182, 2001.
 - 14) Darnell GA, Schroder WA, Antalis TM, Lambley E, Major L, Gardner J, Birrell G, Cid-Arregui A, Suhrbier A. Human papillomavirus E7 requires the protease calpain to degrade the retinoblastoma protein. *J Biol Chem* 282: 37492-37500, 2007.
 - 15) DeMasi J, Huh KW, Nakatani Y, Munger K, Howley PM. Bovine papillomavirus E7 transformation function correlates with cellular p600 protein binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11486-11491, 2005.
 - 16) Doorbar J, Griffin H. Intrabody strategies for the treatment of human papillomavirus-associated disease. *Expert Opin Biol Ther* 7: 677-689, 2007.
 - 17) Duensing A, Liu Y, Tseng M, Malumbres M, Barbacid M, Duensing S. Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication. *Oncogene* 25: 2943-2949, 2006.
 - 18) Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10002-10007, 2000.
 - 19) Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res* 62: 7075-7082, 2002.
 - 20) Duensing S, Munger K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 109: 157-162, 2004.
 - 21) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 3812-3815, 1983.
 - 22) Ferber MJ, Eilers P, Schuurings E, Fenton JA, Fleuren GJ, Kenter G, Szuhai K, Smith DI, Raap AK, Brink AA. Positioning of cervical carcinoma and Burkitt lymphoma translocation breakpoints with respect to the human papillomavirus integration cluster in FRA8C at 8q24.13. *Cancer Genet Cytogenet* 154: 1-9, 2004.
 - 23) Filippova M, Johnson MM, Bautista M, Filippov V, Fodor N, Tungteakkhun SS, Williams K, Duerksen-Hughes PJ. The large and small isoforms of human papillomavirus type 16 E6 bind to and differentially affect procaspase 8 stability and activity. *J Virol* 81: 4116-4129, 2007.
 - 24) Filippova M, Parkhurst L, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. *J Biol Chem* 279: 25729-25744, 2004.
 - 25) Gammoh N, Grm HS, Massimi P, Banks L. Regulation of human papillomavirus type 16 E7 activity through direct protein interaction with the E2 transcriptional activator. *J Virol* 80: 1787-1797, 2006.
 - 26) Garnett TO, Filippova M, Duerksen-Hughes PJ. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 13: 1915-1926, 2006.
 - 27) Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway DA. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 18: 2269-2282, 2004.
 - 28) Grm HS, Massimi P, Gammoh N, Banks L. Crosstalk between the human papillomavirus E2 transcriptional activator and the E6 oncoprotein. *Oncogene* 24: 5149-5164, 2005.
 - 29) Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J Virol* 81: 1379-1389, 2007.
 - 30) Herrick J, Conti C, Teissier S, Thierry F, Couturier J, Sastre-Garau X, Favre M, Orth G, Bensimon A. Genomic organization of amplified MYC genes suggests distinct mechanisms of amplification in tumorigenesis. *Cancer Res* 65: 1174-1179, 2005.
 - 31) Huh KW, DeMasi J, Ogawa H, Nakatani Y, Howley PM, Munger K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11492-11497, 2005.
 - 32) Imoto I, Tsuda H, Hirasawa A, Miura M, Sakamoto M, Hirohashi S, Inazawa J. Expression of cIAP1, a target for 11q22 amplification, correlates with resistance of cervical cancers to radiotherapy. *Cancer Res* 62: 4860-4866, 2002.
 - 33) Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, Ustav M. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J* 26: 2180-2191, 2007.
 - 34) Kanda T, Kukimoto I. [Human papillomavirus and cervical cancer]. *Uirusu* 56: 219-230, 2006.

- 35) Katzenellenbogen RA, Egelkrout EM, Vliet-Gregg P, Gewin LC, Gafken PR, Galloway DA. NFX1-123 and poly(A) binding proteins synergistically augment activation of telomerase in human papillomavirus type 16 E6-expressing cells. *J Virol* 81: 3786-3796, 2007.
- 36) Kiyono T, Foster SA, Koop JL, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396: 84-88, 1998.
- 37) Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11612-11616, 1997.
- 38) Kondo K, Ochi H, Matsumoto T, Yoshikawa H, Kanda T. Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. *J Med Virol* 80: 841-846, 2008.
- 39) Kukimoto I, Kanda T. Displacement of YY1 by differentiation-specific transcription factor hSkN-1a activates the P(670) promoter of human papillomavirus type 16. *J Virol* 75: 9302-9311, 2001.
- 40) Kukimoto I, Takeuchi T, Kanda T. CCAAT/enhancer binding protein beta binds to and activates the P670 promoter of human papillomavirus type 16. *Virology* 346: 98-107, 2006.
- 41) Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H, Band V. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol* 22: 5801-5812, 2002.
- 42) Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AH, Pellegrini S, Matlashewski GJ, Koromilas AE. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically associates with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon-alpha. *Oncogene* 18: 5727-5737, 1999.
- 43) Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79: 328-337, 1992.
- 44) Macville M, Schrock E, Padilla-Nash H, Keck C, Ghadimi BM, Zimonjic D, Popescu N, Ried T. Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res* 59: 141-150, 1999.
- 45) McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 77: 9852-9861, 2003.
- 46) Menges CW, Baglia LA, Lapoint R, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res* 66: 5555-5559, 2006.
- 47) Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM, Darragh TM. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 364: 1678-1683, 2004.
- 48) Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518-527, 2003.
- 49) Nair HB, Luthra R, Kirma N, Liu YG, Flowers L, Evans D, Tekmal RR. Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer Res* 65: 11164-11173, 2005.
- 50) Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene* 26: 2988-2996, 2007.
- 51) Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci* 98: 1505-1511, 2007.
- 52) Narisawa-Saito M, Yoshimatsu Y, Ohno S, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Hirohashi S, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for human cervical cancer. *Cancer Res* 68: 5699-5705, 2008.
- 53) Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *Embo J* 23: 1609-1618, 2004.
- 54) Nguyen ML, Nguyen MM, Lee D, Griep AE, Lambert PF. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. *J Virol* 77: 6957-6964, 2003.
- 55) Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet* 33: 416-421, 2003.
- 56) Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 275: 6764-6769, 2000.
- 57) Patel D, Incassati A, Wang N, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cause polyploidy in human keratinocytes and up-regulation of G2-M-phase proteins. *Cancer Res* 64: 1299-1306, 2004.
- 58) Peter M, Rosty C, Couturier J, Radvanyi F, Teshima H, Sastre-Garau X. MYC activation associated with the integration of HPV DNA at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 25: 5985-5993, 2006.
- 59) Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 212: 356-367, 2007.
- 60) Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GS, Shivji MK, Stanley MA, Coleman N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 3822-3827, 2006.
- 61) Pim D, Massimi P, Dilworth SM, Banks L. Activation

- of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 24: 7830-7838, 2005.
- 62) Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mam-mucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J* 20: 3427-3436, 2001.
 - 63) Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* 12: 2061-2072, 1998.
 - 64) Simonst SJ, Difilippantonio MJ, Lambert PF. Two distinct activities contribute to human papillomavirus 16 E6's oncogenic potential. *Cancer Res* 65: 8266-8273, 2005.
 - 65) Spanos WC, Hoover A, Harris GF, Wu S, Strand GL, Anderson ME, Klingelutz AJ, Hendriks W, Bossler AD, Lee JH. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with ras for invasive growth. *J Virol* 82: 2493-2500, 2008.
 - 66) Steenbergen RD, Kramer D, Braakhuis BJ, Stern PL, Verheijen RH, Meijer CJ, Snijders PJ. TSLC1 gene silencing in cervical cancer cell lines and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 96: 294-305, 2004.
 - 67) Talora C, Sgroi DC, Crum CP, Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev* 16: 2252-2263, 2002.
 - 68) Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* 80 (Pt 6): 1513-1517, 1999.
 - 69) Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 22: 1225-1237, 2003.
 - 70) Tungteakkhun SS, Filippova M, Neidigh JW, Fodor N, Duerksen-Hughes PJ. The interaction between human papillomavirus type 16 and FADD is mediated by a novel E6 binding domain. *J Virol* 82: 9600-9614, 2008.
 - 71) Veeraraghavalu K, Subbaiah VK, Srivastava S, Chakrabarti O, Syal R, Krishna S. Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1;Su(H);Lag-1 activation. *J Virol* 79: 7889-7898, 2005.
 - 72) Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8211-8216, 2003.
 - 73) Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1: 20-26, 1999.
 - 74) Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 64: 3878-3884, 2004.
 - 75) Winder DM, Pett MR, Foster N, Shivji MK, Herdman MT, Stanley MA, Venkitaraman AR, Coleman N. An increase in DNA double-strand breaks, induced by Ku70 depletion, is associated with human papillomavirus 16 episome loss and de novo viral integration events. *J Pathol* 213: 27-34, 2007.
 - 76) Wise-Draper TM, Allen HV, Thobe MN, Jones EE, Habash KB, Munger K, Wells SI. The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. *J Virol* 79: 14309-14317, 2005.
 - 77) Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 7: 11-22, 2007.
 - 78) Wu SY, Lee AY, Hou SY, Kemper JK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chiang CM. Brd4 links chromatin targeting to HPV transcriptional silencing. *Genes Dev* 20: 2383-2396, 2006.
 - 79) Xu M, Luo W, Elzi DJ, Grandori C, Galloway DA. NF1 interacts with mSin3A/histone deacetylase to repress hTERT transcription in keratinocytes. *Mol Cell Biol* 28: 4819-4828, 2008.
 - 80) You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117: 349-360, 2004.
 - 81) Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 27: 3732-3742, 2007.
 - 82) Zhang A, Maner S, Betz R, Angstrom T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A, Wallin KL. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 101: 427-433, 2002.
 - 83) Zhang Y, Fan S, Meng Q, Ma Y, Katiyar P, Schlegel R, Rosen EM. BRCA1 interaction with human papillomavirus oncoproteins. *J Biol Chem* 280: 33165-33177, 2005.
 - 84) zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2: 342-350, 2002.

Molecular basis of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses

Takashi YUGAWA and Tohru KIYONO

Virology Division, National Cancer Center Research Institute

Over the last two decades since discovery of human papillomavirus (HPV) type 16 and 18 DNAs in cervical cancers by Dr. Harald zur Hausen, HPVs have been well characterized as causative agents for cervical cancer. Viral DNA from a specific group of HPVs can be detected in at least 90% of all cervical cancers and two viral genes, *E6* and *E7*, are invariably expressed in HPV-positive cervical cancer cells. Their gene products are known to inactivate the major tumor suppressors, p53 and pRB, respectively. In addition, one function of *E6* is to activate telomerase, and *E6* and *E7* cooperate to effectively immortalize human primary epithelial cells. Though expression of *E6* and *E7* is itself not sufficient for cancer development, it seems to be either directly or indirectly involved in every stage of multi-step carcinogenesis. Indeed, it has been shown that only one or two genetic alterations in addition to expression of *E6* and *E7* are experimentally sufficient to confer tumorigenicity to normal human cervical keratinocytes. Epidemiological and biological studies suggest the potential efficacy of prophylactic vaccines to prevent genital HPV infection as an anti-cancer strategy. However, given the widespread nature of HPV infection and unresolved issues about the duration and type specificity of the currently available HPV vaccines, it is crucial that molecular details of the natural history of HPV infection as well as the biological activities of the viral oncoproteins be elucidated in order to provide the basis for development of new therapeutic strategies against HPV-associated malignancies. This review highlights the novel functions of *E6* and *E7* as well as the molecular mechanisms of HPV-induced carcinogenesis.